



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 133 104**

⑫ Número de solicitud: **9701343**

⑬ Int. Cl.⁶: **C12N 15/53**

C12N 9/04

⑭

SOLICITUD DE PATENTE

A1

② Fecha de presentación: **19.06.97**

③ Fecha de publicación de la solicitud: **16.08.99**

④ Fecha de publicación del folleto de la solicitud: **16.08.99**

⑦ Solicitante/s: **ANTIBIOTICOS, S.A.U.**
Avda. de Burgos, 8 - A
28036 Madrid, ES

⑧ Inventor/es: **Casqueiro, Javier;**
Gutiérrez Martín, Santiago;
Bañuelos, Oscar;
Fierro Fierro, Francisco;
Díez García, Bruno;
Collados de la Vieja, Alfonso;
Salto Maldonado, Francisco;
Barredo Fuente, José Luis y
Martín Martín, Juan Francisco

⑨ Agente: **No consta**

⑤ Título: **Un procedimiento para incrementar la producción de penicilina en *Penicillium chrysogenum* mediante la inactivación del gen *lys2*.**

⑥ Resumen:

Un procedimiento para incrementar la producción de penicilina en *Penicillium chrysogenum* mediante la inactivación del gen *lys2*.

El gen *lys2* de *P. chrysogenum* se ha identificado y aislado mediante hibridación con una sonda correspondiente al homólogo *LYS2* de *Saccharomyces cerevisiae*. El gen de *P. chrysogenum* codifica una proteína de 1.296 aminoácidos y 142.421 Da con una identidad elevada con las reductasas de ácido α -aminoadípico de *S. cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe* y *Candida albicans*. La disrupción del gen *lys2* se ha realizado mediante (I) integración por recombinación simple y (II) sustitución génica por doble recombinación, empleando en ambos casos el gen *pyrG* como marcador de transformación. Los clones disrupcionados se han seleccionado como auxótrofos de lisina y confirmado por hibridación de Southern. Estos mutantes disrupcionados superproducen penicilina (40 %-100 % de incremento con respecto a la cepa parental no disrupcionada) en un medio suplementado con L-lisina 4 mM.

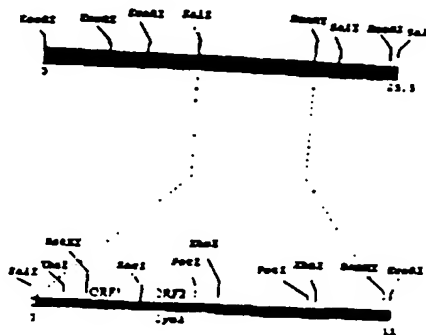


Figura 1

BEST AVAILABLE COPY

DESCRIPCION

Un procedimiento para incrementar la producción de penicilina en *Penicillium chrysogenum* mediante la inactivación del gen *lys2*.

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a un procedimiento para la inactivación del gen *lys2* de *P. chrysogenum* y a las cepas transformadas que lo contienen. La inactivación de este gen, que codifica la actividad α -aminoadipato reductasa, se consigue empleando técnicas de ADN recombinante, más concretamente mediante el procedimiento de disrupción génica. La inactivación del gen *lys2* permite una mayor disponibilidad del ácido α -aminoadípico para la biosíntesis de penicilina, impidiendo su utilización como sustrato para la biosíntesis de lisina. La ruta biosintética de lisina se bloquea inmediatamente después de haberse sintetizado el ácido α -aminoadípico, lo cual supone que en los clones disrupcionados en el gen *lys2* este incremento en la disponibilidad celular de ácido α -aminoadípico provocará a su vez un incremento en la producción de penicilina.

Estado de la técnica

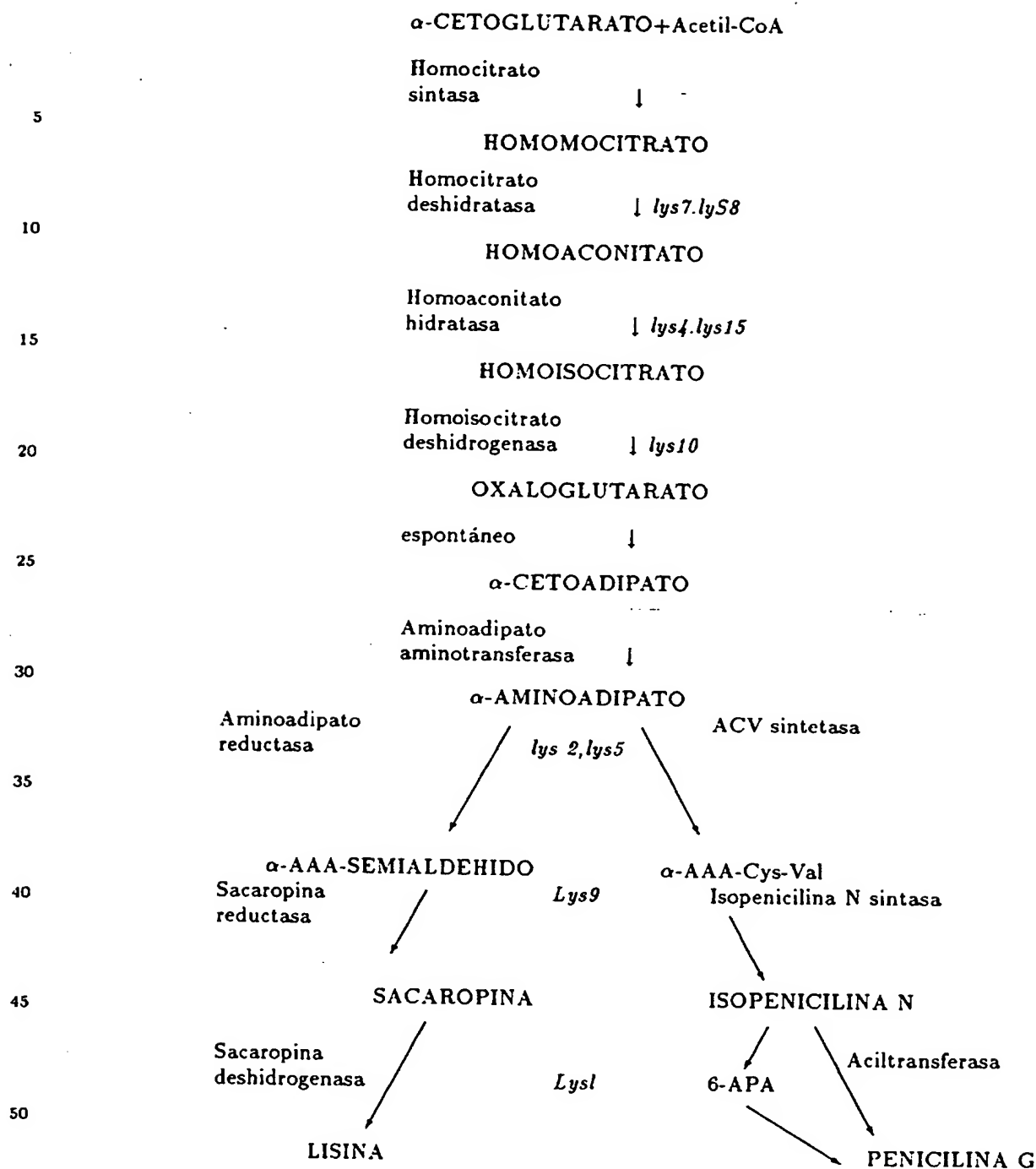
El ácido L- α -aminoadípico es un precursor de la ruta de biosíntesis de penicilina (Martín y Liras 1989, Ann. Rev. Microbiol., 43: 173-114; Aharonowitz *et al.*, 1992, Ann. Rev. Microbiol., 46: 461-495), el cual es condensado junto con L-valina y L-cisteína para formar el tri péptido L- α -aminoadipil-L-cisteinil-D-valina, primer intermediario de la ruta de biosíntesis de β -lactamas (van Liempt *et al.*, 1989, J. Biol. Chem. 6: 529-546; Díez *et al.*, 1990, J. Biol. Chem. 265: 16358-16365; Aharonowitz *et al.*, 1993, Bio/technology 11: 807-810).

El ácido α -aminoadípico es sintetizado en los hongos filamentosos en los pasos iniciales de la ruta de biosíntesis de lisina (ver esquema en página 5). En la naturaleza existen dos rutas diferentes de biosíntesis de lisina. La llamada vía del ácido α -aminoadípico la emplean los hongos y levaduras (Bhattacharjee, 1985, CRC critical reviews of microbiology 12: 131-151), mientras que bacterias y plantas sintetizan lisina a través de la vía del ácido diaminopimélico, una ramificación de la ruta biosintética del ácido aspártico (Eikmanns *et al.*, 1993, Antonie van Leeuwenhoek 64: 145-163; Malumbres y Martín, 1996, FEMS microbiol. lett. 143: 103-114).

El ácido α -aminoadípico es pues el punto de ramificación entre las rutas biosintéticas de lisina y penicilina en *P. chrysogenum* (ver esquema en página 5). La parte común de la vía comienza con la condensación de acetyl-CoA y α -cetoglutarato para formar homocitrato (Jaklitsch y Kubicek, 1990, Biochem. J. 269: 247-253), que es posteriormente convertido a través de una serie de reacciones de isomerización, des carboxilación oxidativa y aminación en homoisocitrato, α -cetoglutarato y α -aminoadipato. En la segunda parte de la vía biosintética de lisina el ácido α -aminoadípico es convertido en α -aminoadípico semialdehído y éste, a través de la sacaropina se convierte en lisina. La primera enzima de la segunda parte de la vía biosintética de lisina, se denomina α -aminoadipato reductasa (E.C. 1.2.1.31) y cataliza la formación del δ -semialdehído del α -aminoadípico en una reacción que se lleva a cabo en dos pasos: (I) activación del grupo δ -carboxilo del ácido α -aminoadípico mediante la formación del derivado adenilado del ácido α -aminoadípico (α -aminoadipiladenilato) y (II) reducción para formar α -aminoadípico- δ -semialdehído (Sagisaka y Shimura, 1960 Nature 188: 1189; 1962, J. Biochem 52: 155). En el primer paso el ácido α -aminoadípico es activado por adenilación utilizando el ATP como donador de AMP, una reacción de activación de aminoácidos inusual, aunque es muy frecuente en la biosíntesis de péptidos no ribosomales (Kleinkauf y von Döhren, 1996 Eur. J. Biochem. 236: 335-351). En el segundo paso el α -aminoadipil-AMP activado es reducido empleando como cofactor NADPH y finalmente es liberado como semialdehído. Estas actividades están codificadas en *S. cerevisiae* por los genes *LYS2* y *LYS5* (Sinha y Bhattacharjee, 1970, Biochem. Biophys. Res. Commun. 39: 1205-1210).

55

60



Descripción detallada de la invención

En la presente invención, se describe por primera vez el gen *lys2* de *P. chrysogenum* y su utilización en la mejora de la producción de penicilina. Utilizando técnicas de ADN recombinante se ha clonado y caracterizado el gen *lys2* de *P. chrysogenum*. Posteriormente este gen se ha disruptado, consiguiendo inactivar totalmente su actividad enzimática. La disruptión de este gen permite la obtención de cepas con un nivel de producción de penicilina incrementado con respecto a la cepa parental no disruptada.

Para la clonación del gen *lys2* de *P. chrysogenum*, se rastreó una genoteca de ADN genómico construida en el vector fágico EMBL3 (Sambrook, J., Fritsch, E.F. y Maniatis, T. 1989. Molecular Cloning: A

Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, USA), empleando como sonda heteróloga un fragmento interno del gen *LYS2* de *S. cerevisiae*. Tras varias series de infección e hibridación se purificaron una serie de fagos positivos, los cuales se mapearon con las enzimas de restricción *Bam*HI, *Hind*III, *Eco*RI y *Sa*II, y posteriormente se subclonó y secuenció un fragmento que contenía la zona de hibridación (Figura 1).

Del análisis de la secuencia se dedujo la existencia de dos marcos de lectura abiertos denominados ORF1 y ORF2. El ORF1 (SEQ ID NO: 1) codificaba una proteína de 129 aminoácidos (SEQ ID NO: 2) que presentaba similitud con las regiones amino-terminales de las reductasas de α -aminoácido de *S. cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe* y *Candida albicans*. El codón de terminación de traducción TAA del ORF1 solapaba en un nucleótido con el codón de inicio de traducción ATG del ORF2. Este segundo marco de lectura de 3.888 nucleótidos (SEQ ID NO: 3) codificaba una proteína de 1.296 aminoácidos y 142.421 Da (SEQ ID NO: 4) que presentaba identidad significativa con la porción central y carboxilo-terminal de las reductasas de ácido α -aminoadípico de *S. cerevisiae* (46,6%), *S. pombe* (44,3%) y *C. albicans* (47,9%).

Para conseguir la inactivación del gen *lys2* de *P. chrysogenum*, se emplearon dos técnicas alternativas: disrupción mediante integración por entrecruzamiento simple y disrupción por doble recombinación. Los transformantes disrupcionados en el gen *lys2*, se caracterizaron por ser auxótrofos de lisina, requiriendo la adición de este aminoácido a una concentración en torno a 1 mM como suplemento en los medios de cultivo.

Para la disrupción mediante integración por entrecruzamiento simple se construyó el plásmido pDLVII (Figura 2), portador de un fragmento de ADN de *P. chrysogenum* que contiene el gen *lys2* carente de su extremo 3' y con una mutación de cambio de marco de lectura en el sitio *Bam*HI. La integración de este vector entre el extremo 3' truncado y la mutación del sitio *Bam*HI provoca la disrupción de la copia *lys2* endógena. La disrupción mediante doble recombinación o sustitución génica se realizó utilizando el plásmido pDLX (Figura 3) el cual contiene un cassette de inactivación génica de 8,8 kb consistente en sustituir un fragmento *Pst*I-*Eco*RV de 200 nucleótidos del gen *lys2* por un inserto de 1,5 kb portador del gen *pyrG* que sirve como marcador de selección.

Las pruebas de fermentación en matraz realizadas con los mutantes disrupcionados en el gen *lys2* mostraron niveles de producción específica de penicilina que suponían incrementos entre el 40% y el 100% con respecto al nivel de producción de la cepa parental no transformada.

Ejemplo 1

1.1. Clonación del gen *lys2* de *P. chrysogenum*.

Con el fin de identificar y aislar el gen *lys2* de *P. chrysogenum*, se empleó como sonda un fragmento interno *Nde*I de 2,0 kb del gen *LYS2* de *S. cerevisiae* marcado por *nick translation* y purificado a través de minicolumnas elutipD (Sigma) para rastrear una genoteca de ADN genómico de *P. chrysogenum* AS-P-78 construida en el vector fágico EMBL3 (Barredo et al., 1989, Gene 83: 291-300). Los fagos positivos fueron purificados y caracterizados mediante análisis de Southern según técnicas estándar (Sambrook, J., Fritsch, E.F. y Maniatis, T. 1989. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, USA): el ADN digerido con las enzimas de restricción *Bam*HI, *Hind*III, *Sa*II, *Xba*I y *Eco*RI se sometió a electroforesis en gel de agarosa y los fragmentos de ADN se transfirieron a membranas de nylon (Hybond, Amersham) para realizar hibridaciones con la sonda *Nde*I de 2,0 kb del gen *LYS2* de *S. cerevisiae* anteriormente mencionada. El análisis de los resultados permitió obtener el mapa genómico que se muestra en la Figura 1. El gen *lys2* de *P. chrysogenum* se subclonó en pBluescript I KS (+) (Stratagene) como un fragmento *Xba*I de 6,5 kb originando los plásmidos pLIIa y pLIIb (ambas orientaciones del fragmento).

1.2. Secuencia de nucleótidos del gen *lys2*.

El inserto de los vectores pLIIa y pLIIb se secuenció empleando los sistemas Erase-a-base (Promega) y Sequenase (USB) de acuerdo con las indicaciones del fabricante. El análisis de la secuencia de 5,1 kb reveló la presencia de dos ORFs denominados ORF1 y ORF2. El ORF1 (SEQ ID NO: 1) codificaba para una proteína de 129 aminoácidos y 14.289 Da (SEQ ID NO: 2). Esta proteína mostró similitud significativa con los extremos amino-terminales de las α -aminoácido reductasas de *S. cerevisiae*, *S. pombe* y *C. albicans*.

El codón de terminación TAA del ORF1 se superponía con el primer nucleótido del triplete de inicio ATG del ORF2. El ORF2 (SEQ ID NO: 3) tenía una extensión de 3.888 nucleótidos y codificaba para una proteína de 1.296 aminoácidos (SEQ ID NO: 4) con un peso molecular deducido de 142.421 Da, mostrando una identidad elevada con las regiones central y-carboxilo-terminal de las α -aminoadipato reductasas codificadas por los genes *LYS2* de *S. cerevisiae* (46,6%), *S. pombe* (44,3%) y *C. albicans* (47,9%).

En la región 3' del gen *lys2* se identificó un intrón al comparar la secuencia genómica con la de un fragmento de ADN complementario (ADNc) obtenido mediante amplificación por PCR en condiciones estándar (Sambrook, J., Fritsch, E.F. y Maniatis, T. 1989. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, USA) con los oligonucleótidos 5' AGT-TCCTTGGGTGCGCTCC 3' y 5' TTTGGACAAGGTATGAGG 3', situados a ambos lados del intrón.

Ejemplo 2

2.1. Disrupción del gen *lys2*.

Se utilizaron dos técnicas de inactivación génica alternativas: disrupción por integración simple y disrupción por doble recombinación. Para la disrupción por integración simple se construyó el vector pDLVII (Figura 2). Con este fin se subclonó un fragmento *XhoI-SalI* de 5 kb portador del gen *lys2* truncado en su extremo 3', en un plásmido derivado de pBluescript I KS (+) (Stratagene) al que se había eliminado el sitio de restricción *BamHI*. Esta construcción intermedia se utilizó para eliminar el sitio de restricción *BamHI* presente en el extremo 5' del gen *lys2* mediante digestión y rellenado con el fragmento Klenow de la ADN polimerasa I de *E. coli* (Amersham), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La eliminación del sitio *BamHI* dio lugar a una mutación de cambio de marco de lectura en el mencionado extremo 5' del gen *lys2*. El fragmento *XhoI-SalI* de 5 kb portador del gen *lys2* truncado en su extremo 3' y mutado en el sitio *BamHI* se subclonó en un derivado del vector pBluescript I KS (+) al que se había introducido el gen *pyrG* como marcador de transformación fúngica, dando lugar al plásmido de inactivación por recombinación simple pDLVII. En la Figura 4 se muestra el proceso teórico de recombinación provocado por la transformación con este vector.

El vector de inactivación por recombinación simple pDLVII se digirió con *BstEII* para forzar la recombinación entre el lugar *BamHI* mutado y el punto de truncamiento en el extremo 3' y se transformó en un mutante auxótrofo *pyrG* de *P. chrysogenum* Wisconsin 54-1255 mediante procedimientos descritos (Cantoral *et al.*, 1987, Bio/technology 5: 497-497; Díez *et al.*, 1987, Curr. Genet. 12: 277-282) plaqueando los protoplastos transformados en medio mínimo Czapeck suplementado con L-lisina 1 mM. Los transformantes obtenidos fueron transferidos a medio mínimo Czapeck con y sin suplemento de L-lisina 1 mM, con el fin de comprobar la aparición de auxotrofia de lisina. Aquellos que mostraron esta deficiencia se analizaron por la técnica de Southern (Sambrook, J., Fritsch, E.F. y Maniatis, T. 1989. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, USA) utilizando como sonda un fragmento interno *EcoRV* de 1,5 kb del gen *lys2*. El ADN total de los transformantes se obtuvo mediante un procedimiento descrito (Barredo *et al.*, 1994, Patente española P9400931) a partir de micelio crecido en medio PM (Anné, 1977, Agricultura 25) suplementado con un 2% de extracto de levadura y con L-lisina 1 mM. Se consideraron transformantes disrupcionados aquellos que carecían del fragmento genómico *BamHI* de 8 kb presente en el patrón de hibridación de la cepa control *P. chrysogenum* Wisconsin 54-1255, presentando en su lugar un fragmento de 13 kb y otro de 2,9 kb.

La disrupción por doble recombinación o sustitución génica se realizó utilizando el plásmido pDLX. Este plásmido se construyó insertando en pBluescript I KS (+) (Stratagene) un cassette de disrupción génica portador del gen *pyrG* de *P. chrysogenum* flanqueado por el fragmento *SalI-PstI* de 4,3 kb con el extremo 5' del gen *lys2* y el fragmento *EcoRV-XbaI* de 3 kb portador del extremo 3' del gen *lys2*. En este cassette de disrupción el gen *pyrG* había sustituido un fragmento *PstI-EcoRV* de 200 nucleótidos del gen *lys2*, impidiendo así su funcionalidad. En la Figura 5 se muestra el proceso de recombinación teórico provocado por la transformación con este vector.

El ADN del vector pDLX se digirió con las enzimas *NotI-KpnI* liberando un fragmento de 8,8 kb portador del cassette de inactivación y esta preparación se utilizó para transformar protoplastos de la cepa *P. chrysogenum* Wisconsin 54-1255 *pyrG*, utilizando procedimientos descritos (Cantoral *et al.*, 1987, Bio/technology 5: 497-497; Díez *et al.*, 1987, Curr. Genet. 12: 277-282) plaqueando los protoplastos transformados en medio mínimo Czapeck suplementado con L-lisina 1 mM. Los transformantes obtenidos fueron transferidos a medio mínimo Czapeck con y sin suplemento de L-lisina 1 mM con el fin de

comprobar la aparición de auxotrofia de lisina. Aquellos que mostraron esta deficiencia se analizaron por la técnica de Southern (Sambrook, J., Fritsch, E.F. y Maniatis, T. 1989. Molecular Cloning : A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, USA) utilizando como sonda un fragmento *EcoRV* de 1,5 kb interno del gen *lys2*. El ADN total de los transformantes se obtuvo mediante un procedimiento descrito (Barredo et al., 1994, Patente española P9400931) a partir de micelio crecido en medio PM (Anné, 1977, Agricultura 25) suplementado con un 2% de extracto de levadura y con L-lisina 1 mM. Se consideraron transformantes disrupticionados aquellos que carecían del fragmento genómico *BamHI* de 8 kb presente en el patrón de hibridación del ADN de la cepa control *P. chrysogenum* Wisconsin 54-1255, presentando en su lugar un fragmento de 2,1 kb. Las cepas transformantes obtenidas se depositaron en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) sita en el Departamento de Microbiología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad de Valencia, Burjassot 46100, Valencia, con el nº 20209.

2.2. Incremento de la producción de penicilina en los transformantes disrupticionados en el gen *lys2*.

Para comprobar el efecto de la disruptición del gen *lys2* sobre la producción de penicilina se realizaron fermentaciones de los transformantes disrupticionados frente a controles de la cepa parental *P. chrysogenum* Wisconsin 54-1255 sin transformar. Las fermentaciones se inocularon con esporas obtenidas de medio de esporulación (Fierro *Et al.*, 1996, Appl. Microbiol. Biotechnol. 44: 597-604) suplementado con L-lisina 1 mM en el caso de los transformantes disrupticionados. Los cultivos de inóculo se realizaron en medio DPM (Esmahan et al., 1994, Appl. Environ. Microbiol. 60: 1705-1710) sin ácido fenilacético pero suplementado con 4% de glucosa y 4 mM de L-lisina y se incubaron a 25°C con agitación orbital (200 r.p.m.) durante 26 horas, salvo en el caso de los auxótrofos de lisina que requirieron 82 horas para alcanzar la misma biomasa.

Las fermentaciones de producción de penicilina se realizaron en matraces de 500 ml con 100 ml de medio DPM al que se añadió ácido fenilacético al 0,1%. Los azúcares lactosa y sacarosa se esterilizaron separadamente y se añadieron al medio DPM base a una concentración final de 3 g/l y 1 g/l respectivamente. Los matraces se suplementaron con L-lisina 4 mM, excepto en controles de la cepa parental (protótrofa) que fueron incubados en presencia y en ausencia de suplemento de L-lisina 4 mM. Los matraces se inocularon con un 10% de los cultivos de inóculo (10 ml), incubándose en las mismas condiciones que éstos. La concentración de penicilina en el medio de cultivo se determinó cada 24 horas por bioensayo frente a *Micrococcus luteus* ATCC 9341, y la biomasa se caracterizó con la misma periodicidad como peso seco.

Como se muestra en la Figura 7, que representa los resultados de una de las fermentaciones, el crecimiento de los mutantes auxótrofos disrupticionados en el gen *lys2* fue ligeramente más lento que el de la cepa parental, aunque al final de la fermentación alcanzaban una biomasa similar. La producción de la cepa parental se incrementó a las 48 horas en medio sin lisina, siendo ligeramente menor en los medios con lisina. Los mutantes disrupticionados mostraron niveles de producción específica de penicilina que suponían un incremento entre el 40% y el 100% respecto de la cepa parental no transformada.

Descripción detallada de las figuras

Figura 1.- Mapa de restricción de la región genómica de *P. chrysogenum* que hibrida con el gen *LYS2* de *S. cerevisiae*, ilustrando la posición de los ORF 1 y ORF 2 identificados en la secuencia de nucleótidos.

Figura 2.- Vector pDLVII construido para la disruptición del gen *lys2* de *P. chrysogenum* por integración simple. Este vector consiste en el fragmento *XhoI-SaII* de 5 kb portador del gen *lys2* truncado en su extremo 3' y mutado en el sitio *BamHI*, subclonado en un derivado del vector pBluescript I KS (+) al que se ha introducido el gen *pyrG* como marcador de transformación fúngica.

Figura 3.- Vector pDLX construido para la disruptición del gen *lys2* de *P. chrysogenum* por doble recombinación. Este vector consiste en pBluescript I KS (+) portador de un cassette de inactivación génica de 8,8 kb que incluye el ORF *lys2* en el que se ha sustituido un fragmento *PstII-EcoRV* de 200 nucleótidos por un inserto de 1,5 kb portador del gen *pyrG* que sirve como marcador de transformación fúngica.

Figura 4.- Esquema teórico del suceso de recombinación génica por entrecruzamiento simple provocado por la integración del vector pDLVII.

Figura 5.- Esquema teórico del suceso de recombinación génica por doble recombinación provocada por la integración del vector pDLX.

Figura 6.- Cinéticas de crecimiento en mg/ml (A) y producción específica de penicilina en $\mu\text{g}/\text{mg}$ peso seco (B), frente al tiempo en horas, de un transformante disrupcionado con el vector pDLVII (triángulos negros) y otro transformado con el vector pDLX (cuadrados negros) frente a controles de la cepa parental Wisconsin 54-1255 suplementada con L-lisina 4mM (círculos negros) o sin suplementar (círculos blancos).

Lista de secuencias

SEQ ID NO: 1

10	GTGGCTGTCT	AGGGCAAGTA	TAGTAGTCTC	AATGCCAAAA	ACACTCAGTG	AATCAGACAA	60
	AGAGGAACAA	CCAGACCTTG	TACTCCGTAC	AACTCCTTAG	TTCTGCCAAT	CTGTGCCGCC	120
	TTGGACTGGA	GAAACCTCAA	CTCCGACGCC	ACCCACCAT	GTACAAGGCG	GTGAATACTC	180
15	TGTGGGGAAA	ATAGCTAATC	AGTGCCTCAA	CTCTCATTGG	CAGAAATAGC	GGCGAGATCG	240
	GACTTTTCCA	CTATGGGGGG	GTAATTTTAA	CATTGAGTCA	TCGTGTCTTT	CATTCTCCAA	300
	CTCTTTCAAA	CATACTGCAA	TT ATG GCT	GTG GGA	ACG GCC	TCT TTG	CAG GAC
			Met Ala Val	Gly Thr	Ala Ser	Leu Gln	Asp
			1	5		10	
20	CGT CTG	GAG ACA	TGG GCA	CAA AGG	TTG AAG	AAC CTG	ACT GTC
	Arg Leu	Glu Thr	Trp Ala	Gln Arg	Leu Lys	Asn Leu	Thr Val
			15	20		25	
	TTG ACT	CGC GAT	TAT CCC	GAT ACA	CAA AAG	ACC GAC	AGC AAG
25	Leu Thr	Arg Asp	Tyr Pro	Asp Thr	Gln Lys	Thr Asp	Ser Lys
			30	35		40	
	ATT GAA	GCC TTC	GAG TCT	CTT CAA	CTC CCC	AAG GCG	AAG CTT
	Ile Glu	Ala Phe	Glu Ser	Leu Gln	Leu Pro	Lys Ala	Lys Leu
			45	50		55	
30	TCA TCA	TCC AGC	TTC ATT	GCT TTC	TTG ACT	GCC TTT	ATT ATC
	Ser Ser	Ser Ser	Phe Ile	Ala Phe	Leu Thr	Ala Phe	Ile Ile
			60	65		70	
	GCG CGG	TTG ACT	GGT GAC	GAG GAC	ATC GCT	GTG GGC	ACA AAC
35	Ala Arg	Leu Thr	Gly Asp	Glu Asp	Ile Ala	Val Gly	Thr Asn
			75	80		85	90
	GAG GAT	GGT CGT	GCA TTC	GTC ATT	CGG GTT	CCC ATT	GAT ACC
	Glu Asp	Gly Arg	Ala Phe	Val Ile	Arg Val	Pro Ile	Asp Thr
			95	100		105	
40	TCT TTC	GCC CAG	CTT TAT	GCC AAA	GTA GAC	AAG GTA	TTT ATA
	Ser Phe	Ala Gln	Leu Tyr	Ala Lys	Val Asp	Lys Val	Phe Ile
			110	115		120	
	TCT TGC	CGT AGT	GTT TAC	TGC TA			
45	Ser Cys	Arg Ser	Val Tyr	Cys			
			125				

Número de hélices: doble.

50 Configuración de la secuencia: lineal.

Tipo de molécula: ADN.

55 Secuencias hipotéticas: No.

Antisentido: No.

Tipo de fragmento:

60 Origen de la molécula: Secuencia de ADN procedente de *P. chrysogenum* correspondiente al ORF 1 del gen *lys2*.

ES 2 133 104 A1

Fuente experimental inmediata de la secuencia: plásmidos pDLIIa y pDLIIb.

Posición de la secuencia en el genoma: Cromosoma IV (5, 6 Mb) en la cepa *P. chrysogenum* P2 y cromosoma III (7,5 Mb) en la cepa *P. chrysogenum* AS-P-78.

5 Características de la secuencia:

Longitud: 711 pares de bases.

10 CDS: 323 ... 709

SEQ ID NO: 2

```

15 Met Ala Val Gly Thr Ala Ser Leu Gln Asp Arg Leu Glu Thr Trp Ala
    1      5      10      15
    Gln Arg Leu Lys Asn Leu Thr Val Ser Pro Leu Thr Arg Asp Tyr Pro
        20      25      30
20 Asp Thr Gln Lys Thr Asp Ser Lys Arg Val Ile Glu Ala Phe Glu Ser
    35      40      45
    Leu Gln Leu Pro Lys Ala Lys Leu Thr Gly Ser Ser Ser Ser Phe Ile
        50      55      60
25 Ala Phe Leu Thr Ala Phe Ile Ile Leu Val Ala Arg Leu Thr Gly Asp
    65      70      75      80
    Glu Asp Ile Ala Val Gly Thr Asn Ser Asn Glu Asp Gly Arg Ala Phe
        85      90      95
    Val Ile Arg Val Pro Ile Asp Thr Ser Glu Ser Phe Ala Gln Leu Tyr
        100      105      110
30 Ala Lys Val Asp Lys Val Phe Ile Tyr Val Ser Cys Arg Ser Val Tyr
    115      120      125
    Cys

```

35 Origen de la molécula: Secuencia de aminoácidos codificada por el ORF1 del gen *lys2* de *P. chrysogenum*.

Características de la secuencia:

40 Longitud: 129 aminoácidos

Peso molecular: 14.289 Da

SEQ ID NO: 3

```

45 ATG GTC TTG CAG GCA TAT AAG GAG GGC TCT TCC CAA ATC GTG CCC TTG      48
    Met Val Leu Gln Ala Tyr Lys Glu Gly Ser Ser Gln Ile Val Pro Leu
    1      5      10      15
50 GGC AGC CTT CGC TCG TAC ATC CAA GAG AAG TCC AAG TCC GAA CGC ACC      96
    Gly Ser Leu Arg Ser Tyr Ile Gln Glu Lys Ser Lys Ser Glu Arg Thr
        20      25      30
55 CCA GTC CTC TTC CGA TTC GCC GCA TAT GAT GCC CCT GCT TCC TCG CAA      144
    Pro Val Leu Phe Arg Phe Ala Ala Tyr Asp Ala Pro Ala Ser Ser Gln
        35      40      45

```

60

ES 2 133 104 A1

5	GAT TAC CCT GCG AAC ACC TTT GAT ACT ACT GAT TTG GTG GTT AAC GTT	192
	Asp Tyr Pro Ala Asn Thr Phe Asp Thr Thr Asp Leu Val Val Asn Val	
	50 55 60	
	GCA CCT GGC TCA GCT GAG GTC GAA TTG GGC GCA TAC TAC AAT CAG CGC	240
	Ala Pro Gly Ser Ala Glu Val Glu Leu Gly Ala Tyr Tyr Asn Gln Arg	
	65 70 75 80	
10	CTT TTC TCA AGT GCT CGT ATT GCT TTC ATT TTG AAG CAA CTA GCC AGT	288
	Leu Phe Ser Ser Ala Arg Ile Ala Phe Ile Leu Lys Gln Leu Ala Ser	
	85 90 95	
	ATT GCT AGC AAT GCC GCC GCC AAT CCG GAT GAG GCT ATC GGA CGT ATC	336
	Ile Ala Ser Asn Ala Ala Ala Asn Pro Asp Glu Ala Ile Gly Arg Ile	
	100 105 110	
15	GAC TTG ATG ACC GAA GAT CAG CGC GCA CTC TTG CCC GAC CCA ACG TGC	384
	Asp Leu Met Thr Glu Asp Gln Arg Ala Leu Leu Pro Asp Pro Thr Cys	
	115 120 125	
20	AAC TTG AAC TGG TCT AAC TTC CGT GGT GCC ATC CAC GAC ATT TTT ACC	432
	Asn Leu Asn Trp Ser Asn Phe Arg Gly Ala Ile His Asp Ile Phe Thr	
	130 135 140	
	GCC AAT GCG GAA CGC CAC CCA GAA AAG CTG TGT GTA GTT GAA ACC CAG	480
	Ala Asn Ala Glu Arg His Pro Glu Lys Leu Cys Val Val Glu Thr Gln	
	145 150 155 160	
25	TCA AGC AGC TCC CCT CAC CCC GAG TTC ACC TAT CGC CAA ATC AAT GAG	528
	Ser Ser Ser Ser Pro His Arg Glu Phe Thr Tyr Arg Gln Ile Asn Glu	
	165 170 175	
30	GCG TCC AAC ATT CTC GGA CAT CAT TTA GTA CGA TCT GGC ATT CAG CCG	576
	Ala Ser Asn Ile Leu Gly His His Leu Val Arg Ser Gly Ile Gln Arg	
	180 185 190	
	GGC GAG GTT GTC ATG GTC TAT GCC TAC CGT GGT GTG GAT CTG GTG GTT	624
	Gly Glu Val Val Met Val Tyr Ala Tyr Arg Gly Val Asp Leu Val Val	
	195 200 205	
35	GCT GTC ATG CGC ATT TTG AAA CCC CGT GCG ACT TTC TCC GTT ATT GAC	672
	Ala Val Met Gly Ile Leu Lys Ala Gly Ala Thr Phe Ser Val Ile Asp	
	210 215 220	
40	CTT GCC TAT CCT CCG GAA CGT CAG AAC ATC TAC CTT GAT GTT GCC CGT	720
	Pro Ala Tyr Pro Pro Glu Arg Gln Asn Ile Tyr Leu Asp Val Ala Arg	
	225 230 235 240	
	CCC CGC GCT TTG GTG AAC ATT GCC AAG GCC ACA AAG GAT GCA GGT GAA	768
	Pro Arg Ala Leu Val Asn Ile Ala Lys Ala Thr Lys Asp Ala Gly Glu	
	245 250 255	
45	CTT TCG GAT ATC GTG CGT ACT TTC ATT GAC GAG AAT CTT GAG CTC CGC	816
	Leu Ser Asp Ile Val Arg Thr Phe Ile Asp Glu Asn Leu Glu Leu Arg	
	260 265 270	
	ACT GAA ATT CTT GCA CTT GCC CTA CTC GAT GAT GGA ACT CTC GCC GGT	864
	Thr Glu Ile Pro Ala Leu Ala Leu Leu Asp Asp Gly Thr Leu Ala Gly	
	275 280 285	
50	GGA TCC ATA AAT GGC CAC CAT GTC TTC GCC AAC GAC GTC GCG CTG AAG	912
	Gly Ser Ile Asn Gly Gln Asp Val Phe Ala Asn Asp Val Ala Leu Lys	
	290 295 300	
55	TCC AAG CCT ACT GGT GTC GTT GGT CCT GAT TCT ATT CCG ACC CTG	960
	Ser Lys Pro Thr Gly Val Val Val Gly Pro Asp Ser Ile Pro Thr Leu	
	305 310 315 320	
	TCT TTC ACG TCC GGC TCG GAA GGC CGG CCG AAG GGC GTT CGT GGC CGA	1008
	Ser Phe Thr Ser Gly Ser Glu Gly Arg Pro Lys Gly Val Arg Gly Arg	
	325 330 335	
60		

ES 2 133 104 A1

5	CAC TTC TCT CTG GCT TAT TAT TTC CCT TGG ATG TCT GAG ACT TTC AAA	1056
	His Phe Ser Leu Ala Tyr Tyr Phe Pro Trp Met Ser Glu Thr Phe Lys	
	340 345 350	
	CTC ACC CCA GAC GAG AAG TTT ACT ATG CTC ACT CCC ATC GCT CAT GAT	1104
	Leu Thr Pro Asp Glu Lys Phe Thr Met Leu Ser Gly Ile Ala His Asp	
	355 360 365	
10	CCT ATT CAG AGA GAC ATT TTC ACC CCG CTC TTC TTG GGT GCT CAA CTC	1152
	Pro Ile Gln Arg Asp Ile Phe Thr Pro Leu Phe Leu Gly Ala Gln Leu	
	370 375 380	
	CTG GTG CCC GCT CGT GAG GAT ATC CAA AAC GAA AAG CTT GCC GAA TGG	1200
	Leu Val Pro Ala Arg Glu Asp Ile Gln Asn Glu Lys Leu Ala Glu Trp	
15	385 390 395 400	
	ATC GAG AAG TAC GGT GCT ACC ATT ACT CAC CTT ACG CCT GCT ATG GGT	1248
	Ile Glu Lys Tyr Gly Ala Thr Ile Thr His Leu Thr Pro Ala Met Gly	
	405 410 415	
20	CAA ATC CTT GTC GGT GGT GCC TCT GCC CAG TTC CCT GCT CTT CAC CAC	1296
	Gln Ile Leu Val Gly Gly Ala Ser Ala Gln Phe Pro Ala Leu His His	
	420 425 430	
	GCC TTC TTT GTG CGT GAC ATT CTG ATT AAG CGA GAC TGC CGC TCA CTC	1344
	Ala Phe Phe Val Gly Asp Ile Leu Ile Lys Arg Asp Cys Arg Ser Leu	
25	435 440 445	
	CAG GGA CTT GCG CCC AAT GTC AGC ATT GTG AAC ATG TAC GGA ACA ACC	1392
	Gln Gly Leu Ala Pro Asn Val Ser Ile Val Asn Met Tyr Gly Thr Thr	
	450 455 460	
30	GAG ACC CAG CGT GCT GTC AGC TAC TAT GAA ATC CCT AGC TAC GCC AGC	1440
	Glu Thr Gln Arg Ala Val Ser Tyr Tyr Glu Ile Pro Ser Tyr Ala Ser	
	465 470 475 480	
	AAC GAC CGC TAC CTG AAC AAT ATC AAA CAT CTC ATT ATG GCT GGT CGC	1488
	Asn Glu Gly Tyr Leu Asn Asn Met Lys Asp Val Ile Met Ala Gly Arg	
	485 490 495	
35	GGA ATG TTG GAT GTG CAG ATG CTG GTT GTC AAC CGC TAT GAC CCC ACT	1536
	Gly Met Leu Asp Val Gln Met Leu Val Val Asn Arg Tyr Asp Pro Thr	
	500 505 510	
40	CGT CTC TGT GCT ATT GGA GAG GTC GGC GAG ATC TAT GTT CGC GCA GGG	1584
	Arg Leu Cys Ala Ile Gly Glu Val Gly Glu Ile Tyr Val Arg Ala Gly	
	515 520 525	
	GGT CTT GCA GAG GGC TAC CTT GGC TCC CCG GAA CTG AGT GCG AAG AAG	1632
	Gly Leu Ala Glu Gly Tyr Leu Gly Ser Pro Glu Leu Ser Ala Lys Lys	
	530 535 540	
45	TTC CTT AAC AAC TGG TTT GTT AAC CCT GAG ATC TGG GCG GAA AAA GAT	1680
	Phe Leu Asn Asn Trp Phe Val Asn Pro Glu Ile Trp Ala Glu Lys Asp	
	545 550 555 560	
	CAA GCC GAA TCC AGG AAT GAG CCC TGG CGT CAA TTC TAC GTT GGT CCG	1728
	Gln Ala Glu Ser Arg Asn Glu Pro Trp Arg Gln Phe Tyr Val Gly Pro	
50	565 570 575	
	CGT GAT CGC CTT TAT CGC AGT GGT GAC CTA GGC CGT TAC ACG CCA TCT	1776
	Arg Asp Arg Leu Tyr Arg Ser Gly Asp Leu Gly Arg Tyr Thr Pro Ser	
	580 585 590	
55	GGA GAT GGT GAA TGT TCT GGC CGC GCC GAC GAT CAA GTG AAG ATT CGT	1824
	Gly Asp Val Glu Cys Ser Gly Arg Ala Asp Asp Gln Val Lys Ile Arg	
	595 600 605	
60	GGT TTC CGT ATT GAG CTT GGA GAG ATC GAC ACC CAT CTC TCT CAG CAC	1872
	Gly Phe Arg Ile Glu Leu Gly Glu Ile Asp Thr His Leu Ser Gln His	
	610 615 620	

ES 2 133 104 A1

	CCA CTG GTT CGT GAG AAC GTG ACC TTG GTG CGA AGA GAT AAA GAC GAG	1920
5	Pro Leu Val Arg Glu Asn Val Thr Leu Val Arg Arg Asp Lys Asp Glu 625 630 635 640	
	GAG CCC ACA TTG GTC AGC TAC TTT GTA CCT CAT ATG AAC AAG TGG GCC	1968
	Glu Pro Thr Leu Val Ser Tyr Phe Val Pro Asp Met Asn Lys Trp Ala 645 650 655	
10	TCA TGG TTG GAG AGC AAG GGC CTT AAG GAT GAT GAC TCT GAC TCC GAG	2016
	Ser Trp Leu Glu Ser Lys Gly Leu Lys Asp Asp Asp Ser Asp Ser Glu 660 665 670	
	GGT ATG GTC GGT CTG TTG CGA CGC TTC CGT CCT CTC CGT GAT GAT GCT	2064
15	Gly Met Val Gly Leu Leu Arg Arg Phe Arg Pro Leu Arg Asp Asp Ala 675 680 685	
	CGT GAG CAT CTC CGG ACT AAG CTC CCT ACA TAC GCA GTG CCG ACC GTT	2112
	Arg Glu His Leu Arg Thr Lys Leu Pro Thr Tyr Ala Val Pro Thr Val 690 695 700	
20	ATC ATT CCC CTC AAG CGC ATG CCT CTG AAC CCG AAC GGC AAG ATC GAC	2160
	Ile Ile Pro Leu Lys Arg Met Pro Leu Asn Pro Asn Gly Lys Ile Asp 705 710 715 720	
	AAG CCC GCG CTT CCT TTC CCA GAT ACT GCA GAG CTG AGC GCC GCT GCA	2208
	Lys Pro Ala Leu Pro Phe Pro Asp Thr Ala Glu Leu Ser Ala Ala Ala 725 730 735	
25	CCC CGC CGC GCC TCG TCT GCA TTG CAG GCC CTC TCT CAA ACT CAG CAG	2256
	Pro Arg Arg Ala Ser Ser Ala Leu Gln Ala Leu Ser Glu Thr Glu Gln 740 745 750	
30	ACT CTG GCT CAA GTC TGG GCC AAG CTC ATT CCC AAT GTG ACT TCT CGC	2304
	Thr Leu Ala Gln Val Trp Ala Lys Leu Ile Pro Asn Val Thr Ser Arg 755 760 765	
	ATG ATT GGC CCG GAT GAC TCC TTC TTT GAT CTC CCC CCC CAC AGT ATC	2352
	Met Ile Gly Pro Asp Asp Ser Phe Phe Asp Leu Gly Gly His Ser Ile 770 775 780	
35	CTC GCA CAA CAA ATG TTC TTC GAG CTT CGC CGT AAG TGG CGT GTT ATT	2400
	Leu Ala Gln Gln Met Phe Phe Glu Leu Arg Arg Lys Trp Arg Val Ile 785 790 795 800	
40	GAT ATC AGT ATG AAT GCT ATC TTC CGC AGC CCG ACC CTC AAG GGC TTT	2448
	Asp Ile Ser Met Asn Ala Ile Phe Arg Ser Pro Thr Leu Lys Gly Phe 805 810 815	
	GCC AGC GAG ATC GAC CGC CTG CTA GCA ATG GAA TCA TTC GCA ACT AGC	2496
	Ala Ser Glu Ile Asp Arg Leu Leu Ala Met Glu Ser Phe Ala Thr Ser 820 825 830	
45	GAT GAC AAG ACT CTA GCT GTG CAG GCT GCC AAT GAG CCG GAC GAC GAG	2544
	Asp Asp Lys Thr Leu Ala Val Gln Ala Ala Asn Glu Pro Asp Asp Glu 835 840 845	
50	TAC TCC AAG GAT GCC GTC CAG CTT GTG AAT GAA TTG CCT AAG ACG TTC	2592
	Tyr Ser Lys Asp Ala Val Gln Leu Val Asn Glu Leu Pro Lys Thr Phe 850 855 860	
	CCT CAG CGT ACG GAG GCT ATG CTC ACT AGC GAA CCC ACA GTG TTC CTC	2640
	Pro Gln Arg Thr Glu Ala Met Leu Thr Ser Glu Pro Thr Val Phe Leu 865 870 875 880	
55	ACT GGA GCC ACT GGT TTC CTA GGC GCA CAT ATC CTC CGA GAT CTA CTT	2688
	Thr Gly Ala Thr Gly Phe Leu Gly Ala His Ile Leu Arg Asp Leu Leu 885 890 895	
	ACC CGC AAG TCT CCT TCC ACT AAG GTG GTG GCT CTG GTT CCG GCA AAG	2736
60	Thr Arg Lys Ser Pro Ser Thr Lys Val Val Ala Leu Val Arg Ala Lys 900 905 910	

ES 2 133 104 A1

	ACC GAG CAG CTG GCA CTC GAG CGA CTT CGC TCC ACT TGC CGC GCA TAT	2784
5	Thr Glu Glu Leu Ala Leu Glu Arg Leu Arg Ser Thr Cys Arg Ala Tyr	
	915 920 925	
	GGT TTC TGG GAT GAA GCG TGG ACT GCC AAG CTG CAA GCT GTC TGT GGT	2832
	Gly Phe Trp Asp Glu Ala Trp Thr Ala Lys Leu Gln Ala Val Cys Gly	
	930 935 940	
10	GAT CTT GGA AAG CCG CAG TTT GGT CTT TCC CAG TCA GTA TGG GAC GAC	2880
	Asp Leu Gly Lys Pro Gln Phe Gly Leu Ser Gln Ser Val Trp Asp Asp	
	945 950 955 960	
	CTT ACC AAC CGC CTC GAT GCT GTA ATT CAC AAC CGA GCC CTT GTC CAC	2928
	Leu Thr Asn Arg Val Asp Ala Val Ile His Asn Gly Ala Leu Val His	
	965 970 975	
15	TGG GTC TAC CCC TAT GCG ACA CTC AGA CCG GCT AAT GTC ATC GGT ACA	2976
	Trp Val Tyr Pro Tyr Ala Thr Leu Arg Pro Ala Asn Val Met Gly Thr	
	980 985 990	
20	ATT GAT GCC CTC AAG CTG TGC GCC AGC GGA AAG GCC AAG CAG TTT GCC	3024
	Ile Asp Ala Leu Lys Leu Cys Ala Ser Gly Lys Ala Lys Gln Phe Ala	
	995 1000 1005	
	TTT GTC AGT TCG ACC AGT GCT TTG GAT AAG GAT CGT TAC GTC CAA GAA	3072
	Phe Val Ser Ser Thr Ser Ala Leu Asp Lys Asp Arg Tyr Val Gln Glu	
	1010 1015 1020	
25	TCC GAA CGT ATC ATC GCC GCC GGT GGA AAT GGT ATC AGC GAA CAC GAC	3120
	Ser Glu Arg Ile Ile Ala Ala Gly Gly Asn Gly Ile Ser Glu Asp Asp	
	1025 1030 1035 1040	
30	GAT ATC GAG GGC AGC AGA GTT GGC CTT GGA ACC GGT TAC GGA CAA AGC	3168
	Asp Met Glu Gly Ser Arg Val Gly Leu Gly Thr Gly Tyr Gly Gln Ser	
	1045 1050 1055	
	AAA TGG GCC GGT GAA TAC CTT GTC AAA GAG GCC CGC CGC AGA GGC CTG	3216
	Lys Trp Ala Gly Glu Tyr Leu Val Lys Glu Ala Gly Arg Arg Gly Leu	
	1060 1065 1070	
35	AGG GGA ACC ATT GTT CGC TCC GGA TAT GTT CTT GGT GAT TCC CTC ACC	3264
	Arg Gly Thr Ile Val Arg Ser Gly Tyr Val Leu Gly Asp Ser Val Thr	
	1075 1080 1085	
	GGA ACT ACC AAT ACT GAT GAT TTC CTC ATC CGT ATG CTT AAG GGC TGC	3312
	Gly Thr Thr Asn Thr Asp Asp Phe Leu Ile Arg Met Leu Lys Gly Cys	
40	1090 1095 1100	
	ATT CAA ATT GGC CTT CGC CCG AAT ATC TTC AAC ACC GTG AAC ATG GTG	3360
	Ile Gln Ile Gly Leu Arg Pro Asn Ile Phe Asn Thr Val Asn Met Val	
	1105 1110 1115 1120	
45	CCT GTT GAT CAT GTG GCT CGT ATT GTC ATT GCC ACT GCC TTC CAC CCA	3408
	Pro Val Asp His Val Ala Arg Ile Val Ile Ala Thr Ala Phe His Pro	
	1125 1130 1135	
	CCT GCC ACA GGC GTC AAC GTC GCC CAT GTT ACC GGA CAC CCT CGT TTG	3456
	Pro Ala Thr Gly Val Asn Val Ala His Val Thr Gly His Pro Arg Leu	
50	1140 1145 1150	
	CGC TTT AAC CAG TTC CTT GGT GCG CTC GAG CTC TAC GGA TAC AAT GTC	3504
	Arg Phe Asn Gln Phe Leu Gly Ala Leu Glu Leu Tyr Gly Tyr Asn Val	
	1155 1160 1165	
55	CCT CAC GTT GAC TAC GTG CCT TGG TCT ACT TCC CTT GAG CAG TAT GTC	3552
	Pro Gln Val Asp Tyr Val Pro Trp Ser Thr Ser Leu Glu Gln Tyr Val	
	1170 1175 1180	
	AAC GAC CGC GAG CAC AAT GAC AAG GAG TCT CAG CAT GCT CT GTAAGTC	3600
	Asn Asp Gly Glu His Asn Asp Lys Glu Ser Gln His Ala Leu	
60	1185 1190 1195	

	CCTCACTTTG CTCAGCCCCT TAACGGATGA ATACTGACCT TATTTAG T ATG CCC	3654
	Met Pro	
5	1200	
	CTT TAC CAC TTC GTT ACC TCA GAC CTT CCC TCC AAC ACC AAG GCC CCC	3702
	Leu Tyr His Phe Val Thr Ser Asp Leu Pro Ser Asn Thr Lys Ala Pro	
	1205 1210 1215	
10	GAA CTG GAT GAT GTG AAC GCA GCG ACC GCT CTG CGT GCC GAT GCC ACC	3750
	Glu Leu Asp Asp Val Asn Ala Ala Thr Ala Leu Arg Ala Asp Ala Thr	
	1220 1225 1230	
	TGG TCG GGC GTT GAC GCA TCA GCC GGT GCT GGC GTG ACT GAG GAA TTA	3798
15	Trp Ser Gly Val Asp Ala Ser Ala Gly Ala Gly Val Thr Glu Glu Leu	
	1235 1240 1245	
	GTT GGC TTA TAT GCC TCA TAC CTT GTC CAA ACC GGT TTC CTG CCC GCG	3846
	Val Gly Leu Tyr Ala Ser Tyr Leu Val Gln Thr Gly Phe Leu Pro Ala	
	1250 1255 1260	
20	CCG ACG GTT GCT GGA GCC CGC CCT CTG CCT GCT GCT CAG ATC AGT GAG	3894
	Pro Thr Val Ala Gly Ala Arg Pro Leu Pro Ala Ala Gln Ile Ser Glu	
	1265 1270 1275 1280	
	GAA CAG AAG AAG ACT CTG TTG AGT GTC GGT GGC CGT GGC GGT ACA TCT	3942
25	Glu Gln Lys Lys Thr Leu Leu Ser Val Gly Gly Arg Gly Gly Thr Ser	
	1285 1290 1295	
	TAAGAAATTT ATAAAAAGAT CTCATGTACT TATTCTGATT TTATAAAAGC AATTGCATTT	4002
	CCAAGCTCCC CAAAAAATGT GTAGTAAATT GAGCCATCAA AGACGAGGCT TGTATTTTGT	4062
	ATACAACCCT GATAGTACGG AGTCGTTTGA TTCTTCACGA AAAAGCCCGA TTCGCGGATC	4122
30	TGCCCCGTTCT GTGATACTCG GACTCACCGT TTGGCTCCCC GCTCTTTATT TACTCTCTTT	4182
	GAGAGTTTAT ATAGTCCCCA ACATATCTTC TGTCTTTCTT TCTTCTGTAT CTCTCTCCAT	4242
	TAGTATTCCA TCATGTCTGA AGGTAAGTGT GAGAGTGTTT ATGCGCGTCC TTGGCAATTC	4302
	AACTTCCCCG TCAGTTTTTC CCGCTTTCTC TCTTATCGGT CATTCAACCC GAAACTGTCG	4362
35	GAGCTCTGTG AGAAGTACCA CGCATCGGTT GTTGGGATTA	4402

Número de hélices: doble.

40 Configuración de la secuencia: lineal.

Tipo de molécula: ADN.

Secuencias hipotéticas: No.

45 Antisentido: No.

Tipo de fragmento: .

50 Origen de la molécula: Secuencia de ADN procedente de *P. chrysogenum* correspondiente al ORF 2 del gen *lys2*.

Fuente experimental inmediata de la secuencia: plásmido pDLIIa y pDLIIb.

55 Posición de la secuencia en el genoma: Cromosoma IV (5,6 Mb) en la cepa *P. chrysogenum* P2 y cromosoma III (7,5 Mb) en la cepa *P. chrysogenum* AS-P-78.

Características de la secuencia:

60 Longitud: 4.402 pares de bases.

CDS: Unir (1..3593, 3648..3942).

ES 2 133 104 A1

Intrón: 3594..3647.

SEQ ID NO: 4

```

5      Met Val Leu Gln Ala Tyr Lys Glu Gly Ser Ser Gln Ile Val Pro Leu
      1          5          10          1
      Gly Ser Leu Arg Ser Tyr Ile Gln Glu Lys Ser Lys Ser Glu Arg Thr
      20          25          30
10     Pro Val Leu Phe Arg Phe Ala Ala Tyr Asp Ala Pro Ala Ser Ser Gln
      35          40          45
      Asp Tyr Pro Ala Asn Thr Phe Asp Thr Thr Asp Leu Val Val Asn Val
      50          55          60
15     Ala Pro Gly Ser Ala Glu Val Glu Leu Gly Ala Tyr Tyr Asn Gln Arg
      65          70          75          80
      Leu Phe Ser Ser Ala Arg Ile Ala Phe Ile Leu Lys Gln Leu Ala Ser
      85          90          95
20     Ile Ala Ser Asn Ala Ala Ala Asn Pro Asp Glu Ala Ile Gly Arg Ile
      100          105          110
      Asp Leu Met Thr Glu Asp Gln Arg Ala Leu Leu Pro Asp Pro Thr Cys
      115          120          125
25     Asn Leu Asn Trp Ser Asn Phe Arg Gly Ala Ile His Asp Ile Phe Thr
      130          135          140
      Ala Asn Ala Glu Arg His Pro Glu Lys Leu Cys Val Val Glu Thr Gln
      145          150          155          160
      Ser Ser Ser Ser Pro His Arg Glu Phe Thr Tyr Arg Gln Ile Asn Glu
      165          170          175
30     Ala Ser Asn Ile Leu Gly His His Leu Val Arg Ser Gly Ile Gln Arg
      180          185          190
      Gly Glu Val Val Met Val Tyr Ala Tyr Arg Gly Val Asp Leu Val Val
      195          200          205
35     Ala Val Met Gly Ile Leu Lys Ala Gly Ala Thr Phe Ser Val Ile Asp
      210          215          220
      Pro Ala Tyr Pro Pro Glu Arg Gln Asn Ile Tyr Leu Asp Val Ala Arg
      225          230          235          240
40     Pro Arg Ala Leu Val Asn Ile Ala Lys Ala Thr Lys Asp Ala Gly Glu
      245          250          255
      Leu Ser Asp Ile Val Arg Thr Phe Ile Asp Glu Asn Leu Glu Leu Arg
      260          265          270
45     Thr Glu Ile Pro Ala Leu Ala Leu Leu Asp Asp Gly Thr Leu Ala Gly
      275          280          285
      Gly Ser Ile Asn Gly Gln Asp Val Phe Ala Asn Asp Val Ala Leu Lys
      290          295          300
50     Ser Lys Pro Thr Gly Val Val Val Gly Pro Asp Ser Ile Pro Thr Leu
      305          310          315          320
      Ser Phe Thr Ser Gly Ser Glu Gly Arg Pro Lys Gly Val Arg Gly Arg
      325          330          335

```

55

60

	His	Phe	Ser	Leu	Ala	Tyr	Tyr	Phe	Pro	Trp	Met	Ser	Glu	Thr	Phe	Lys
				340					345					350		
5	Leu	Thr	Pro	Asp	Glu	Lys	Phe	Thr	Met	Leu	Ser	Gly	Ile	Ala	His	Asp
			355					360					365			
	Pro	Ile	Gln	Arg	Asp	Ile	Phe	Thr	Pro	Leu	Phe	Leu	Gly	Ala	Gln	Leu
			370					375					380			
10	Leu	Val	Pro	Ala	Arg	Glu	Asp	Ile	Gln	Asn	Glu	Lys	Leu	Ala	Glu	Trp
	385					390					395					400
	Ile	Glu	Lys	Tyr	Gly	Ala	Thr	Ile	Thr	His	Leu	Thr	Pro	Ala	Met	Gly
					405				410						415	
	Gln	Ile	Leu	Val	Gly	Gly	Ala	Ser	Ala	Gln	Phe	Pro	Ala	Leu	His	His
				420					425					430		
15	Ala	Phe	Phe	Val	Gly	Asp	Ile	Leu	Ile	Lys	Arg	Asp	Cys	Arg	Ser	Leu
			435					440					445			
	Gln	Gly	Leu	Ala	Pro	Asn	Val	Ser	Ile	Val	Asn	Met	Tyr	Gly	Thr	Thr
	450					455					460					
20	Glu	Thr	Gln	Arg	Ala	Val	Ser	Tyr	Tyr	Glu	Ile	Pro	Ser	Tyr	Ala	Ser
	465					470					475					480
	Asn	Glu	Gly	Tyr	Leu	Asn	Asn	Met	Lys	Asp	Val	Ile	Met	Ala	Gly	Arg
					485				490						495	
25	Gly	Met	Leu	Asp	Val	Gln	Met	Leu	Val	Val	Asn	Arg	Tyr	Asp	Pro	Thr
			500						505					510		
	Arg	Leu	Cys	Ala	Ile	Gly	Glu	Val	Gly	Glu	Ile	Tyr	Val	Arg	Ala	Gly
			515					520					525			
	Gly	Leu	Ala	Glu	Gly	Tyr	Leu	Gly	Ser	Pro	Glu	Leu	Ser	Ala	Lys	Lys
	530						535					540				
30	Phe	Leu	Asn	Asn	Trp	Phe	Val	Asn	Pro	Glu	Ile	Trp	Ala	Glu	Lys	Asp
	545					550				555						560
	Gln	Ala	Glu	Ser	Arg	Asn	Glu	Pro	Trp	Arg	Gln	Phe	Tyr	Val	Gly	Pro
					565					570					575	
35	Arg	Asp	Arg	Leu	Tyr	Arg	Ser	Gly	Asp	Leu	Gly	Arg	Tyr	Thr	Pro	Ser
			580						585					590		
	Gly	Asp	Val	Glu	Cys	Ser	Gly	Arg	Ala	Asp	Asp	Gln	Val	Lys	Ile	Arg
			595					600					605			
40	Gly	Phe	Arg	Ile	Clu	Leu	Gly	Glu	Ile	Asp	Thr	His	Leu	Ser	Gln	His
	610						615					620				
	Pro	Leu	Val	Arg	Glu	Asn	Val	Thr	Leu	Val	Arg	Arg	Asp	Lys	Asp	Glu
	625					630					635					640
	Glu	Pro	Thr	Leu	Val	Ser	Tyr	Phe	Val	Pro	Asp	Met	Asn	Lys	Trp	Ala
					645					650					655	
45	Ser	Trp	Leu	Glu	Ser	Lys	Gly	Leu	Lys	Asp	Asp	Asp	Ser	Asp	Ser	Glu
			660						665					670		
	Gly	Met	Val	Gly	Leu	Leu	Arg	Arg	Phe	Arg	Pro	Leu	Arg	Asp	Asp	Ala
			675					680				685				
50	Arg	Glu	His	Leu	Arg	Thr	Lys	Leu	Pro	Thr	Tyr	Ala	Val	Pro	Thr	Val
	690						695					700				
	Ile	Ile	Pro	Leu	Lys	Arg	Met	Pro	Leu	Asn	Pro	Asn	Gly	Lys	Ile	Asp
	705					710					715					720
55	Lys	Pro	Ala	Leu	Pro	Phe	Pro	Asp	Thr	Ala	Glu	Leu	Ser	Ala	Ala	Ala
					725					730					735	
	Pro	Arg	Arg	Ala	Ser	Ser	Ala	Leu	Gln	Ala	Leu	Ser	Glu	Thr	Glu	Gln
				740					745					750		
60	Thr	Leu	Ala	Gln	Val	Trp	Ala	Lys	Leu	Ile	Pro	Asn	Val	Thr	Ser	Arg
			755					760						765		

ES 2 133 104 A1

Met Ile Gly Pro Asp Asp Ser Phe Phe Asp Leu Gly Gly His Ser Ile
 770 775 780
 5 Leu Ala Gln Gln Met Phe Phe Glu Leu Arg Arg Lys Trp Arg Val Ile
 785 790 795 800
 Asp Ile Ser Met Asn Ala Ile Phe Arg Ser Pro Thr Leu Lys Gly Phe
 805 810 815
 10 Ala Ser Glu Ile Asp Arg Leu Leu Ala Met Glu Ser Phe Ala Thr Ser
 820 825 830
 Asp Asp Lys Thr Leu Ala Val Gln Ala Ala Asn Glu Pro Asp Asp Glu
 835 840 845
 Tyr Ser Lys Asp Ala Val Gln Leu Val Asn Glu Leu Pro Lys Thr Phe
 850 855 860
 15 Pro Gln Arg Thr Glu Ala Met Leu Thr Ser Glu Pro Thr Val Phe Leu
 865 870 875 880
 Thr Gly Ala Thr Gly Phe Leu Gly Ala His Ile Leu Arg Asp Leu Leu
 885 890 895
 20 Thr Arg Lys Ser Pro Ser Thr Lys Val Val Ala Leu Val Arg Ala Lys
 900 905 910
 Thr Glu Glu Leu Ala Leu Glu Arg Leu Arg Ser Thr Cys Arg Ala Tyr
 915 920 925
 25 Gly Phe Trp Asp Glu Ala Trp Thr Ala Lys Leu Gln Ala Val Cys Gly
 930 935 940
 Asp Leu Gly Lys Pro Gln Phe Gly Leu Ser Gln Ser Val Trp Asp Asp
 945 950 955 960
 Leu Thr Asn Arg Val Asp Ala Val Ile His Asn Gly Ala Leu Val His
 965 970 975
 30 Trp Val Tyr Pro Tyr Ala Thr Leu Arg Pro Ala Asn Val Met Gly Thr
 980 985 990
 Ile Asp Ala Leu Lys Leu Cys Ala Ser Gly Lys Ala Lys Gln Phe Ala
 995 1000 1005
 35 Phe Val Ser Ser Thr Ser Ala Leu Asp Lys Asp Arg Tyr Val Gln Glu
 1010 1015 1020
 Ser Glu Arg Ile Ile Ala Ala Gly Gly Asn Gly Ile Ser Glu Asp Asp
 1025 1030 1035 1040
 40 Asp Met Glu Gly Ser Arg Val Gly Leu Gly Thr Gly Tyr Gly Gln Ser
 1045 1050 1055
 Lys Trp Ala Gly Glu Tyr Leu Val Lys Glu Ala Gly Arg Arg Gly Leu
 1060 1065 1070
 Arg Gly Thr Ile Val Arg Ser Gly Tyr Val Leu Gly Asp Ser Val Thr
 1075 1080 1085
 45 Gly Thr Thr Asn Thr Asp Asp Phe Leu Ile Arg Met Leu Lys Gly Cys
 1090 1095 1100
 Ile Gln Ile Gly Leu Arg Pro Asn Ile Phe Asn Thr Val Asn Met Val
 1105 1110 1115 1120
 50 Pro Val Asp His Val Ala Arg Ile Val Ile Ala Thr Ala Phe His Pro
 1125 1130 1135
 Pro Ala Thr Gly Val Asn Val Ala His Val Thr Gly His Pro Arg Leu
 1140 1145 1150
 55 Arg Phe Asn Gln Phe Leu Gly Ala Leu Glu Leu Tyr Gly Tyr Asn Val
 1155 1160 1165
 Pro Gln Val Asp Tyr Val Pro Trp Ser Thr Ser Leu Glu Gln Tyr Val
 1170 1175 1180
 Asn Asp Gly Glu His Asn Asp Lys Glu Ser Gln His Ala Leu Met Pro
 1185 1190 1195 1200
 60

ES 2 133 104 A1

	Leu	Tyr	His	Phe	Val	Thr	Ser	Asp	Leu	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Ala	Pro
					1205					1210					1215	
5	Glu	Leu	Asp	Asp	Val	Asn	Ala	Ala	Thr	Ala	Leu	Arg	Ala	Asp	Ala	Thr
					1220					1225					1230	
	Trp	Ser	Gly	Val	Asp	Ala	Ser	Ala	Gly	Ala	Gly	Val	Thr	Glu	Glu	Leu
					1235					1240					1245	
10	Val	Gly	Leu	Tyr	Ala	Ser	Tyr	Leu	Val	Gln	Thr	Gly	Phe	Leu	Pro	Ala
					1250					1255					1260	
	Pro	Thr	Val	Ala	Gly	Ala	Arg	Pro	Leu	Pro	Ala	Ala	Gln	Ile	Ser	Glu
					1265											1280
	Glu	Gln	Lys	Lys	Thr	Leu	Leu	Ser	Val	Gly	Gly	Arg	Gly	Gly	Thr	Ser
15					1285											
										1290						1295

Origen de la molécula: Secuencia de aminoácidos codificada por el ORF2 del gen *lys2* de *P. chrysogenum*.

Características de la secuencia:

Longitud: 1.296 aminoácidos

Peso molecular: 142.421 Da

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para incrementar la producción de penicilina en *Penicillium chrysogenum* caracterizado por inactivar el gen que codifica para la actividad enzimática α -aminoacido reductasa, en dicho microorganismo.
2. Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque la inactivación del gen se lleva a cabo mediante la disrupción del mismo.
3. Procedimiento según las reivindicaciones 1 y 2, caracterizado porque la disrupción del gen se logra mediante integración por recombinación homóloga simple de una construcción de ADN transformante que contiene al menos una o parte del gen que se va a inactivar.
4. Procedimiento según las reivindicaciones 1 y 2, caracterizado porque la disrupción del gen se logra mediante sustitución génica por doble recombinación homóloga de una construcción de ADN transformante que contiene al menos una parte del gen que se va a inactivar.
5. Procedimiento según las reivindicaciones 3 y 4, caracterizado porque la construcción de ADN transformante es una molécula circular que lleva un fragmento de ADN interno al gen que se va a inactivar.
6. Procedimiento según las reivindicaciones 3 y 4, caracterizado porque la construcción de ADN transformante es una molécula de ADN lineal, cuya parte central y esencial del gen a inactivar ha sido sustituida por un fragmento de ADN no relacionado que contiene un marcador de transformación que interrumpe la secuencia codificante.
7. Procedimiento según las reivindicaciones 1 a 6, caracterizado porque el gen a inactivar es el gen *lys2*.
8. Procedimiento según las reivindicaciones 1 a 7, en que se emplea como marcador de transformación el gen *pyrG*.
9. Compuesto de ADN aislado de *P. chrysogenum* y definido por el mapa de restricción que aparece en la Fig. 1, el cual incluye el gen *lys2*.
10. Secuencia de ADN identificada como SEQ ID NO : 1.
11. Secuencia de aminoácidos identificada como SEQ ID NO : 2, que se corresponde con la proteína codificada por SEQ ID NO : 1.
12. Secuencia de ADN identificada como SEQ ID NO : 3.
13. Secuencia de aminoácidos identificada como SEQ IP NO : 4, que se corresponde con la proteína codificada por SEQ ID NO : 3.
14. Vectores que portan los compuestos de ADN descritos en las reivindicaciones 9, 10 y 12 o fragmentos de los mismos que expresen una funcionalidades análogas a los compuestos íntegros.
15. Vectores de acuerdo con la reivindicación 14, caracterizados por consistir en un plásmido.
16. Plásmido de acuerdo con la reivindicación 15, caracterizado por consistir en pDLVII.
17. Plásmido de acuerdo con la reivindicación 15, caracterizado por consistir en pDLX.
18. Secuencias nucleotídicas caracterizadas por ser capaces de hibridar bajo condiciones restrictivas con los compuestos de ADN de las reivindicaciones 9, 10 ó 12 y que expresen funcionalidades análogas a las que expresan éstos.
19. Organismos hospedantes transformados caracterizados porque se les han introducido las secuencias de ADN de las reivindicaciones 9, 10 ó 12.
20. Organismos hospedantes según la reivindicación 19 caracterizados porque las secuencias de ADN introducidas están incluidas total o parcialmente en los vectores de las reivindicaciones 14 a 17.

21. Organismos hospedantes transformados según las reivindicaciones 19 y 20 caracterizados por consistir en un eucariota, preferentemente un hongo filamentoso.

5 22. Organismos hospedantes transformados según reivindicación 21, caracterizados por consistir preferentemente en *P. chrysogenum*.

23. Cepa transformada de *P. chrysogenum* en la que una construcción de ADN que lleva una versión truncada, incompleta o inactiva de un gen que codifica para la enzima α -aminoadipato reductasa, implicada en la biosíntesis de lisina, inactiva el gen endógeno tras su integración por recombinación homóloga.

24. Una cepa transformada de *P. chrysogenum*, conforme a la reivindicación 23, en la que dicho gen codifica una enzima con actividad α -aminoadipato reductasa.

15 25. Cepa transformada de *P. chrysogenum*, conforme a la reivindicaciones 23 y 24, en la que dicho gen es *lys2*, el gen de *P. chrysogenum* que codifica una enzima con actividad α -aminoadipato reductasa, definida por las secuencias proteicas que se muestran en SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 4.

20 26. Cepa transformada de *P. chrysogenum*, conforme a las reivindicaciones 23 y 24, en la que dicho gen es un homólogo funcional de *lys2*, con procedencia distinta de *P. chrysogenum*, procedente de otras especies emparentadas filogenéticamente, y cuya similitud en la secuencia de ADN con el gen *lys2* de *P. chrysogenum* es suficiente para mediar recombinación homóloga con el locus endógeno de *P. chrysogenum* y expresar una funcionalidad análoga a la expresada por éste.

25 27. *P. chrysogenum* transformado según las reivindicaciones 23 a 25, caracterizado por consistir en cepas puras representadas por CECT 20209 o sus mutantes y derivados transformados.

28. Procedimiento para la obtención de organismos transformados con una producción incrementada de penicilina caracterizado por comprender al menos las operaciones de:

- 30
- * Construir vectores que porten, total o parcialmente, SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3 o compuestos de ADN recombinante de las mismas que expresen funcionalidades análogas a dichas secuencias.
 - * Introducir los vectores anteriores en organismos hospedantes obteniendo organismos transformados con el gen *lys2* inactivado.
 - * Seleccionar los organismos transformados que presentan incrementada la producción de penicilina cuando se comparan con organismos controles sin transformar.
- 35

29. Procedimiento para la obtención de organismos transformados según la reivindicación 28, caracterizado porque los vectores construidos son los definidos en las reivindicaciones 14 a 17.

30. Procedimiento según las reivindicaciones 28 y 29, caracterizado porque los organismos hospedantes transformados son los definidos en las reivindicaciones 19 a 27.

45

50

55

60

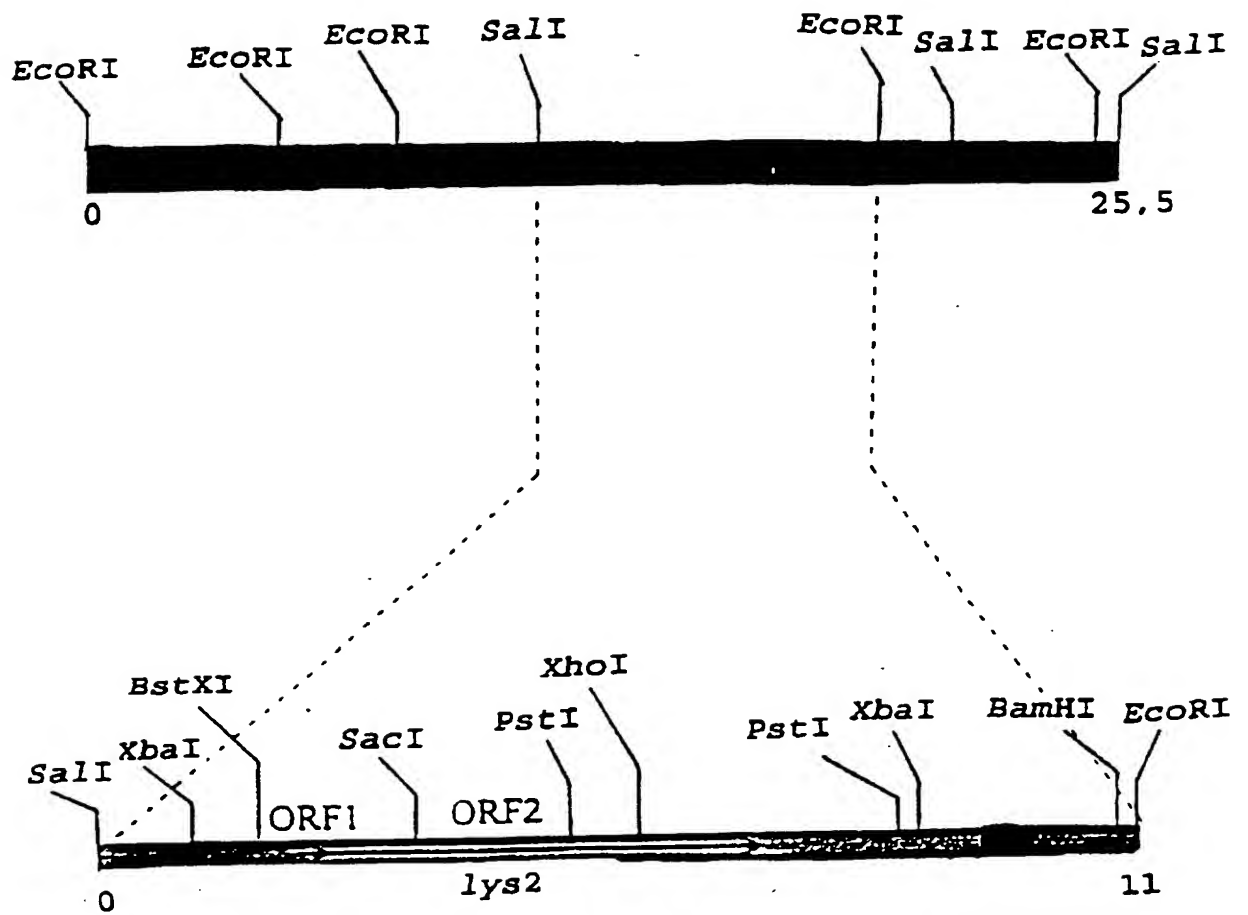


Figura 1

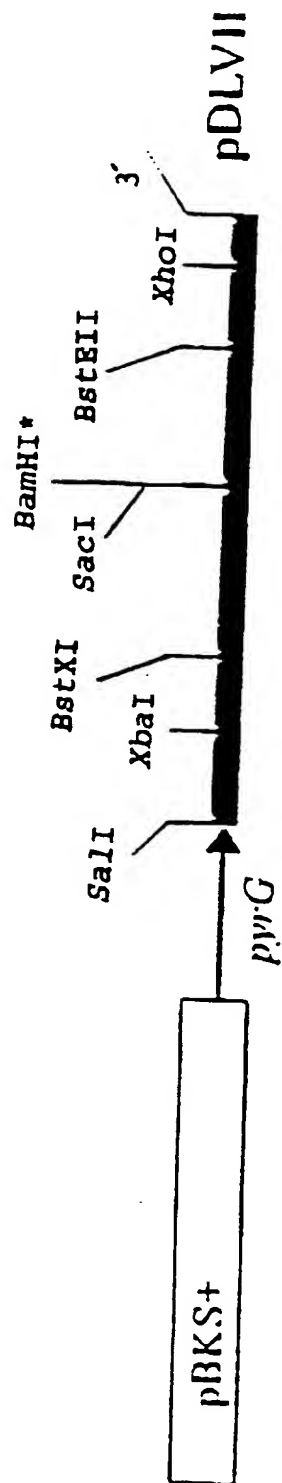


Figura 2

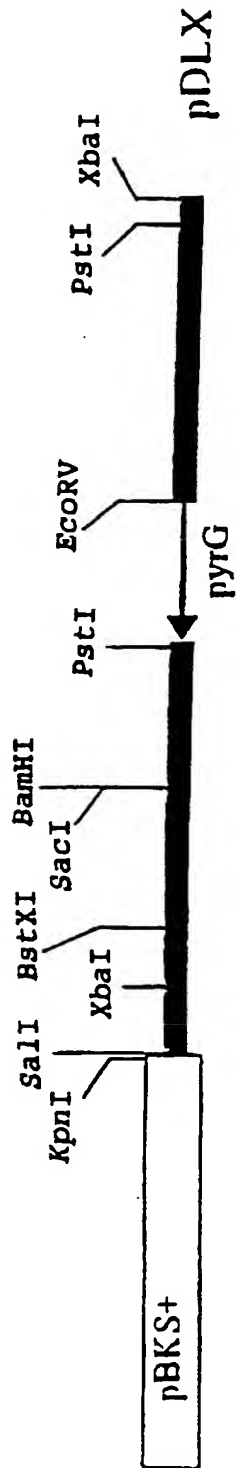


Figura 3

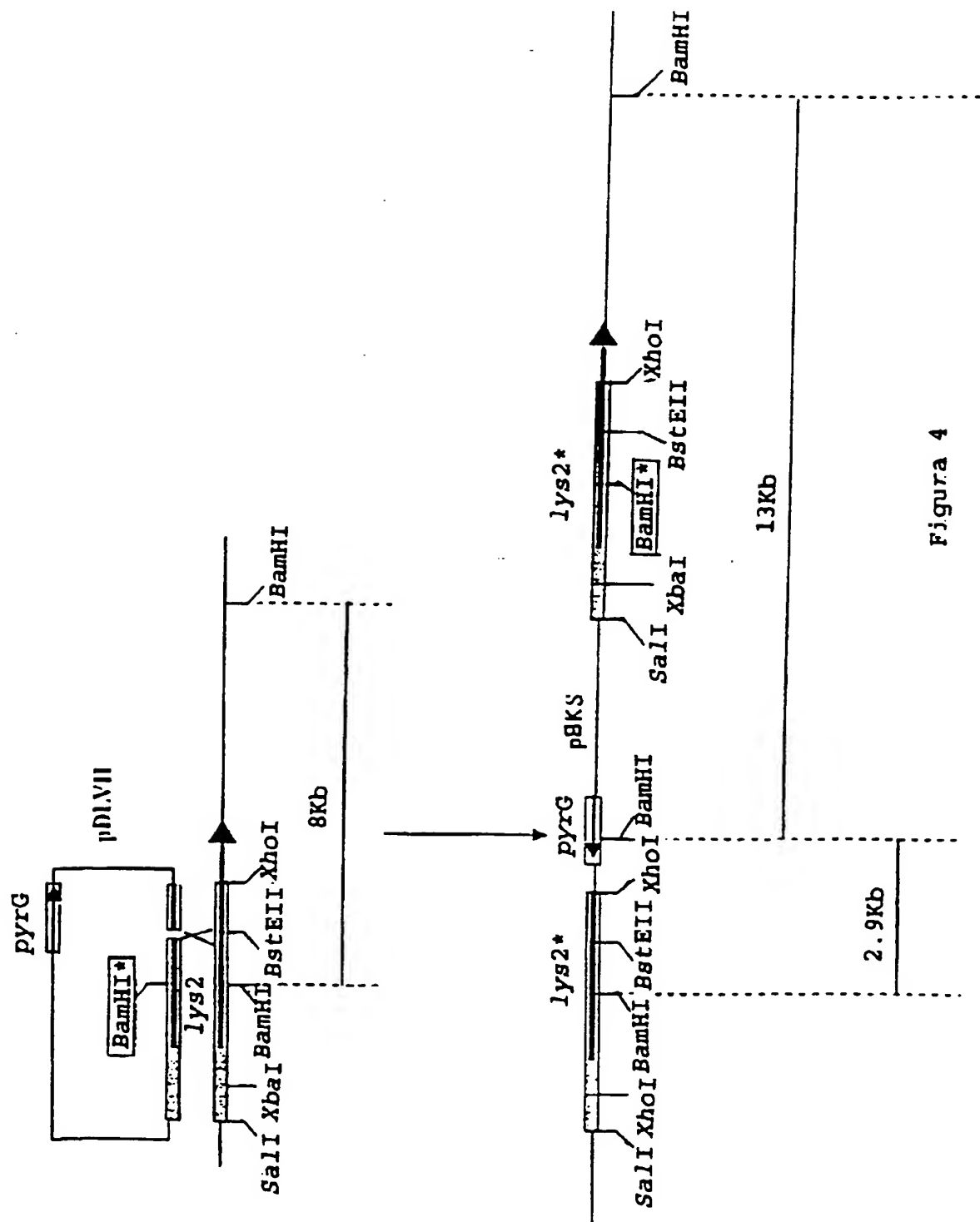


Figura 4

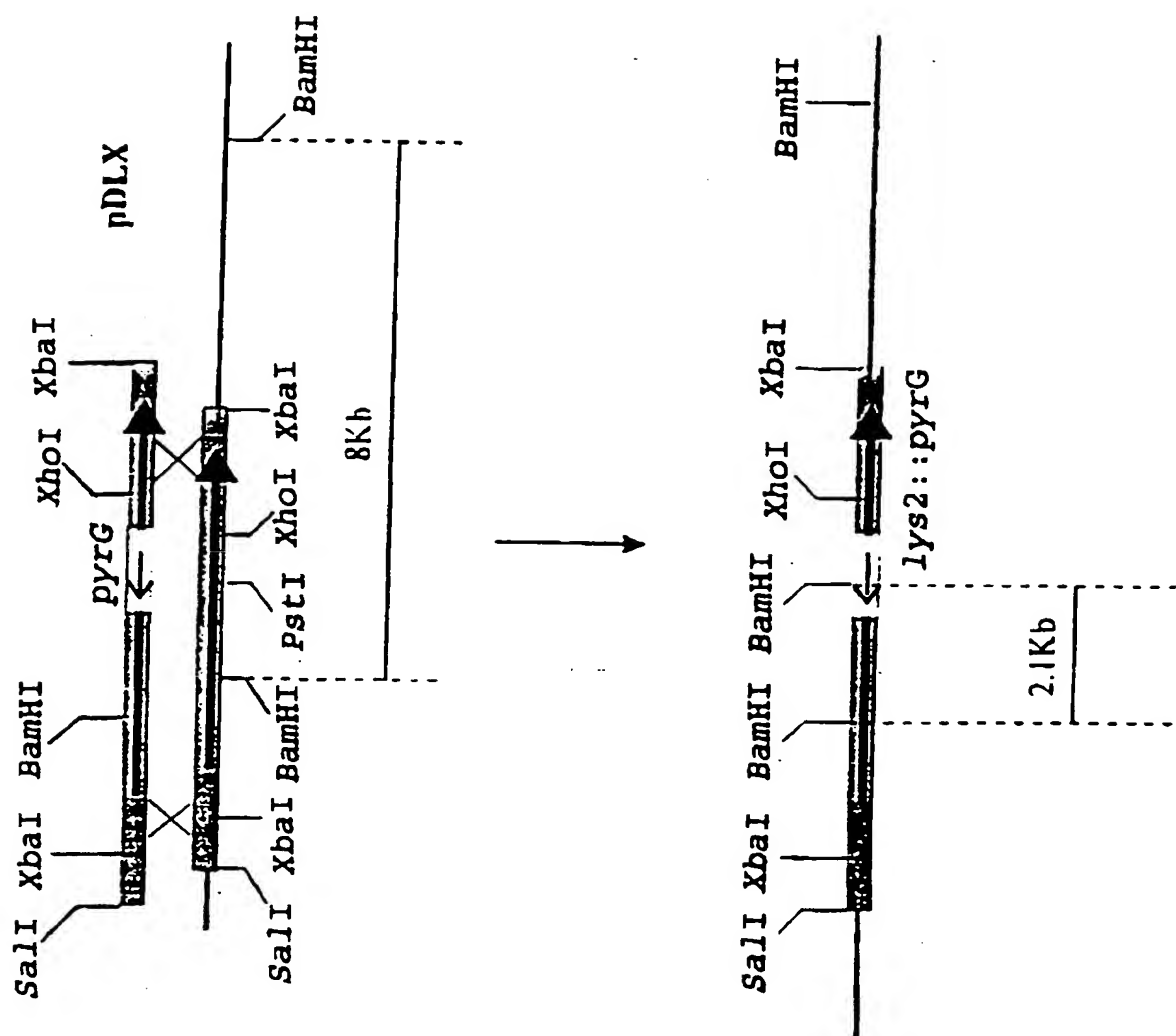


Figura 5

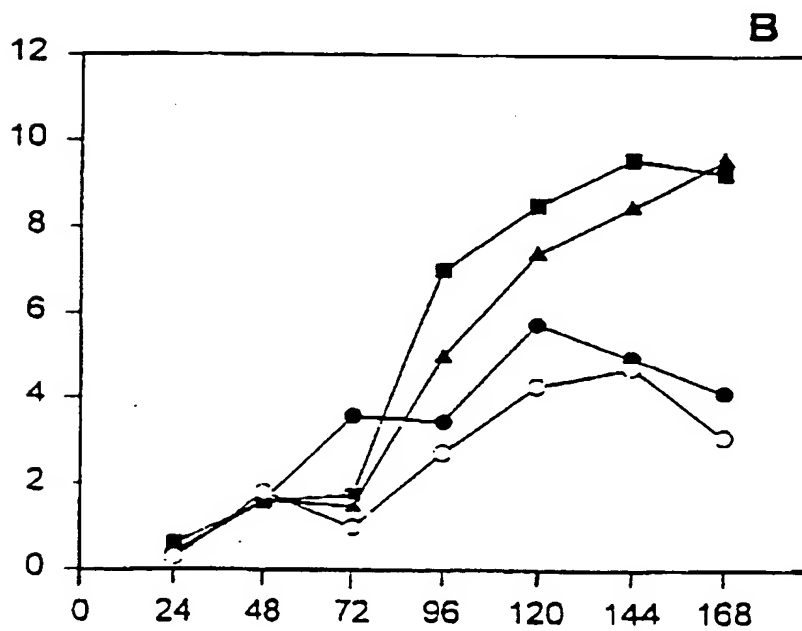
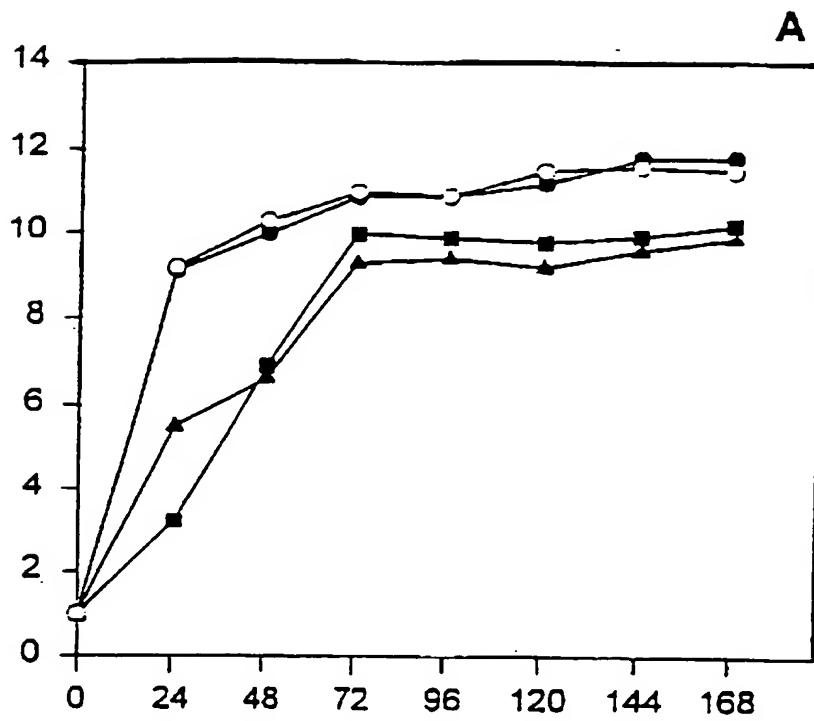


Figura 6



INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑮ Int. Cl.º: C12N 15/53, 9/04

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
Y	LU, Y. et al. "Regulation of alpha-aminoadipate reductase from <i>Penicillium chrysogenum</i> in relation to the flux from alpha-aminoadipate into penicillin biosynthesis". CAN. J. MICROBIOL., 1992, Vol. 38, páginas 758-763, todo el documento.	1-7,28
Y	EIBEL, H. et al. "Identification of the cloned <i>S. cerevisiae</i> LYS2 gene by an integrative transformation approach". MOL. GEN. GENET., 1983, Vol. 191, N° 1, páginas 66-73, todo el documento.	1-4,6,7,28
Y	BARNES, D.A. et al. "Genetic manipulation of <i>Saccharomyces cerevisiae</i> by use of the LYS2 gene". MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY, 1986, Vol. 6, N° 8, páginas 2828-2838, páginas 2835-2837; figura 6.	1-5,7,28
A	HÖNLINGER, C. et al. "Differential effects of general amino acid control of lysine biosynthesis on penicillin formation in strains of <i>Penicillium chrysogenum</i> ". THE JOURNAL OF ANTIBIOTICS, 1988, Vol. 41, N° 2, páginas 255-257, todo el documento.	1-30

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones

☐ para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
30.06.99

Examinador
J.L. Vizán Arroyo

Página
1/1

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.